

22. Rotariu, Traian, *Probleme prioritare și opțiuni politice în abordarea problemei populației - Dezbateri: Populația și Dezvoltarea - Un binom esențial pentru viitorul României*, 2006.
23. Ursea, Nicolae, *Esențialul în Nefrologie - Rinichiul și îmbătrânirea*, 2000.
24. Zarcovic, Grijica; Enăchescu, Dan, *Probleme privind politicile de sănătate în țările Europene centrale și de răsărit - Evoluția recentă și perspectivele sistemului de sănătate în România*.
25. ****Economic and Social Implications of Populations Aging. United Nations Publication.*
26. ****The World Aging Situation: Strategies and Policies. United Nations Publication.*
27. ****Cartea verde a populației României - Comisia națională pentru Populație și dezvoltare*, 2006.
28. ****Strategia Națională de sănătate publică*, 2004.
29. ****Ancheta medicală a stării de sănătate a populației iunie - iulie 1997*, C.C.S.S., București.

Rezumat

În contextul actual al îmbătrânirii populației, tendință remarcată atât pe plan mondial, european, cât și pe plan național, este explicabilă o creștere a ponderii problemelor de sănătate și a afecțiunilor specifice acestei categorii de vârstă.

Prin prisma particularităților terapiei, prognosticului, recuperării specifice pacienților vârstnici și a costurilor crescute, se impune o adaptare a politicilor de sănătate prin elaborarea și aplicarea unor strategii eficiente pe termene scurt, mediu și lung, care să cuprindă activitatea tuturor instituțiilor din domeniul sanitar și să corecteze toți factorii implicați.

Summary

In the actual contextually of the ageing population, tendency apparent in all world, in Europe and in ours country, it's explicable growing of the health problems and specific affections of elderly patients.

Owing to characteristics of therapy, to prognosis, to specific recuperation of elderly patients and expensive cost price, it's necessary a readjustment of sanitary policy by elaboration and application capable strategies, short-dated, mean and long-term, who cover activity of all implicate medical care institutions and to correct all determinant factors.

ANALIZA MOLECULAR-GENETICĂ A POLIMORFISMULUI VNTR ALELELOR LA BOLNAVII CU FENILCETONURIE DIN REPUBLICA MOLDOVA

Angela Gavriliuc ¹, dr. în biologie, **Stanislav Groppa** ², dr. h. în medicină, prof.univ., membru corespondent, **Anatol Jacotă** ³, dr. h. în biologie, academician, Centrul Național de Sănătate a Reproducerii și Genetică Medicală ¹, USMF „N.Testemițanu” ², Institutul de Genetică și Fiziologie a Plantelor al A.Ș.M. ³

Mutațiile în gena fenilalaninhidroxilaza (FAH) cauzează o afecțiune autosomal-recisivă gravă - fenilcetonuria (FCU), care este una dintre cele mai răspândite dereglări ereditare ale schimbului de aminoacizi. Maladia se caracterizează prin afectarea preponderentă a sistemului nervos și prin diverse dereglări psihice ca rezultat al modificării metabolismului fenilalaninei (FA) în organism, condiționat, la rândul său, de reducerea activității fermentului hepatic FAH.

Gena FAH este localizată pe brațul lung al cromozomului 12, în regiunea q22-24.1 (Lidsky, 85). Având o lungime de 90 kb, ea este constituită din 13 exoni și codifică proteina ce conține 451 de aminoacizi (Deka, 91). În această genă sunt localizate site-uri de restricție pentru 7 endonuclease și un număr variabil de repetări în tandem (VNTR), precum și haplotipuri, potrivit cărora se creează o cuplare dezechilibrată cu mutații ale genei FAH cu grad înalt de heterozigotitate (Eisensmith, 94).

Prezența anumitor alele polimorfe permite marcarea genei mutante și urmărirea ei în procesul transmiterii la urmași.

Materiale și metode. Pentru cercetările molecular-genetice întreprinse au fost folosite mostre de ADN colectate de la membrii a 59 de familii cu fenilketonurie, forma clasică, pecum și de la 68 de persoane din populația sănătoasă a Republicii Moldova. Extragerea ADN-ului din limfocitele sângelui venos a fost efectuată prin metoda standard de extracție fenol-chloroform. Analiza polimorfismului VNTR alelelor genei FAH a fost efectuată prin metoda reacției de polimerizare în lanț, descrisă mai înainte (Goltsov, 92). Evaluarea dezechilibrului înlănțuirii s-a realizat cu utilizarea coeficientului de corelație Pearson și a criteriului acestuia χ^2 .

Rezultate și discuții. Studiarea markerilor ADN polimorfi, cuplați cu gena FAH, prezintă interes în ceea ce privește acțiunile concrete diagnostice molecular-genetice în practica consultului medico-genetic pentru depistarea fenilketonuriei în regiunea explorată.

Drept rezultat al analizei polimorfismului numărului variabil al repetărilor în tandem (VNTR) al genei FAH s-au identificat alelele cu dimensiunile 380, 470, 500, 530, 560 și 650 bp (*fig. 1*), care corespund copiilor repetitive 3, 6, 7, 8, 9 și 12 ale locusului polimorf VNTR și au fost descrise pentru populațiile Europei și Chinei (Goltsov, 92). Alela cu lungimea de 440 bp a fost descrisă prima dată pentru popoarele din regiunea Volga-Ural, dar printre locuitorii R. Moldova aceasta nu a fost depistată (Ахметова, 2000).

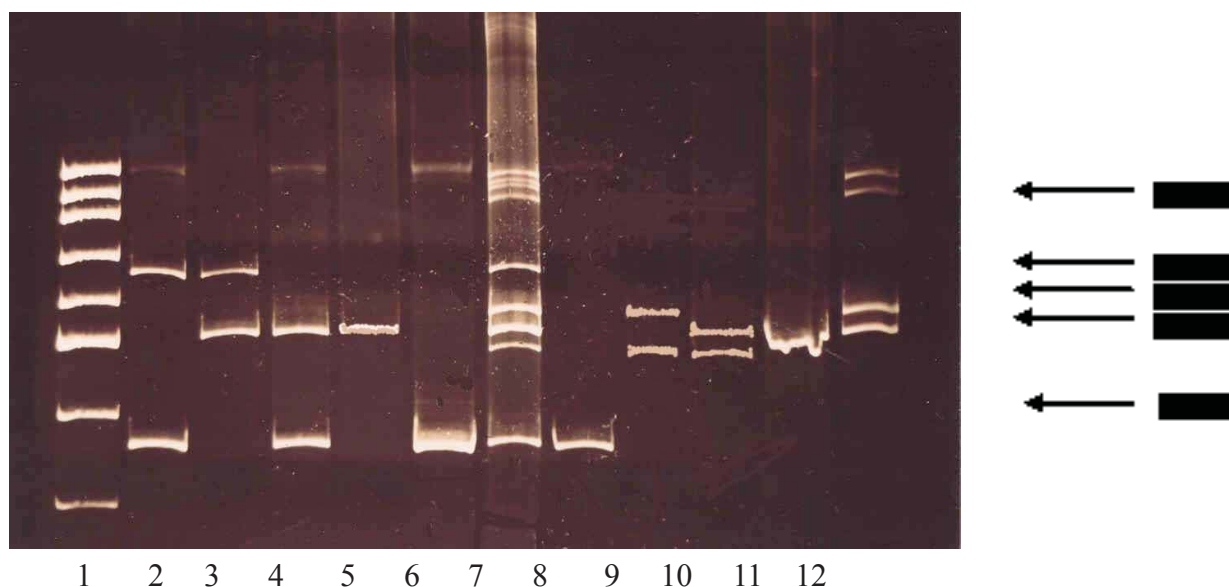


Fig. 1. Separarea prin electroforeza VNTR a alelelor genei FAH:

1 – markerul masei moleculare (DNA ladder 100 bp); 2 – 380/650; 3 – 530/650; 4 – 380/530; 5,11 – 530/530; 6,8 – 380/380; 7 – VNTR – markerul (380, 500, 530, 560 și 650 bp); 9 – 500/560; 10 – 500/530; 12 – 530/560

Din analiza polimorfismului sistemului VNTR s-a constatat că alela 380 bp prevalează atât pe cromozomii mutanți, cât și pe cei normali. Astfel, pe cromozomii mutanți incidența acesteia a constituit 0,68, iar pe cei normali a fost de două ori mai redusă (0,32). Pe poziția secundară, după frecvența depistării pe cromozomii mutanți și pe cei normali, s-a plasat alela VNTR 530 bp cu incidența de respectiv 0,20 și 0,43 (*fig. 2*).

Similară a fost distribuția alelelor de lungimea 500 bp pe cromozomii mutanți și pe cei normali (respectiv 0,10 și 0,13). Pe cromozomii normali este de trei ori mai frecventă alela VNTR cu lungimea de 560 bp (0,08). Numai pe cromozomii normali a fost stabilită alela cu dimensiunea de 650 bp, cu o frecvență de 0,03. Studiile realizate au arătat la o diferență semnificativă în distribuția de frecvență a alelelor pe locusul examinat între cromozomii normali și cei mutanți ($\chi^2 = 32,15$; $df = 2$, $p < 0,001$).

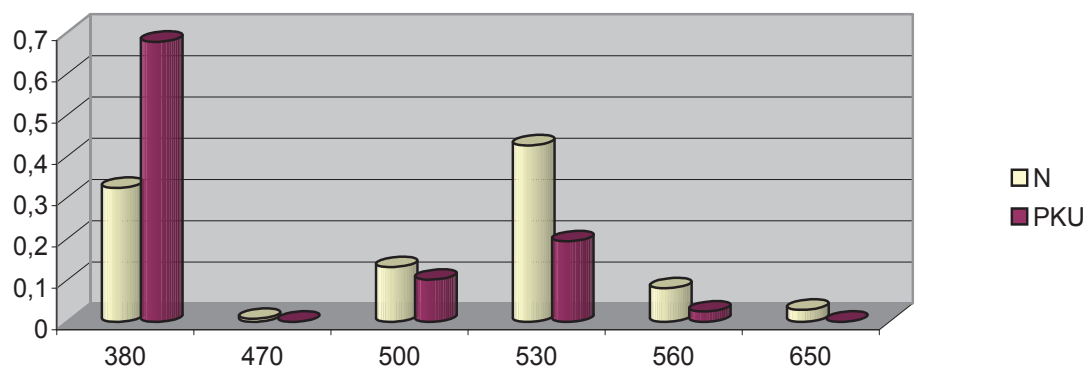


Fig. 2. Distribuția de frecvență a alelelor VNTR ale genei FAH pe cromozomii normali și mutanți în familiile cu FCU din R. Moldova

Pentru locusul VNTR în populația R. Moldova cea mai răspândită s-a dovedit a fi alela 380 bp, atestată cu frecvența de 0,68. Aceasta corespunde cu datele din literatura de specialitate privind distribuția de frecvență a alelelor VNTR pe cromozomii mutanți de origine europeană și chineză (Eisensmith, 94) (*tab. 1*). Deși există această similitudine, la analiza comparată s-au determinat diferențe de valoare statistică între distribuția de frecvență a alelelor VNTR pe cromozomii mutanți ai bolnavilor din R. Moldova și Europa ($\chi^2=34,05$; $df=2$, $p<0,001$). În același timp, distribuția alelelor pe toți cromozomii mutanți înclină spre creșterea incidenței alelei 380 bp, ceea ce relevă influența componentei asiatică în constituirea structurii genetice a populației R. Moldova. Analiza comparată a arătat că frecvența alelelor VNTR ale genei FAH printre locuitorii Republicii Moldova și cei asiatici diferă considerabil ($\chi^2=13,71$; $df=2$, $p<0,001$).

Tabelul 1

Distribuția de frecvență a alelelor VNTR pe locusul genei FAH pe cromozomii mutanți în Europa, China (Eisensmith, 94) și în Republica Moldova

Alela	Populația europeană (n=361)		Populația Chinei (n=32)		Populația Republicii Moldova (n=118)	
	n	PKU	n	PKU	n	PKU
380	110	0,34 $\pm 0,044$	25	0,771 $\pm 0,074$	80	0,678 $\pm 0,043$
500	80	0,21 $\pm 0,028$	0	-	12	0,102 $\pm 0,027$
530	146	0,38 $\pm 0,042$	2	0,062 $\pm 0,042$	23	0,195 $\pm 0,036$
560	12	0,03 $\pm 0,018$	5	0,167 $\pm 0,065$	3	0,025 $\pm 0,014$
650	13	0,04 $\pm 0,018$	0	-	0	-

Notă: n – numărul de cromozomi.

Rezultatele investigării caracterelor de repartiție a genotipurilor VNTR ale genei FAH în populația R. Moldova sunt prezentate în *tab.2*. În ansamblul de 59 de bolnavi examinați cu FCU la 9 s-au determinat genotipuri VNTR. O eterogenitate mai înaltă după numărul de genotipuri identificate s-a apreciat în eșantionul de populație sănătoasă (11 haplotipuri).

O frecvență mai înaltă de detecție pe cromozomii normali a determinat genotipul 380/530 (0,32), în timp ce la bolnavii de FCU acest haplotip era întâlnit în 23,4 % cazuri. Cu o frecvență egală (0,15) printre cromozomii normali se aprecia genotipul 500/530 și 530/530, iar la bolnavi acesta prezenta o frecvență de respectiv 3,4% și 5,1% cazuri. De patru ori mai frecvent (49,1% cazuri) s-a atestat la bolnavi genotipul 380/380, care în populația sănătoasă prezenta o frecvență de 0,12. Din rezultatele

obținute putem deduce o înlănțuire dezechilibrată constantă pentru acest genotip între cromozomii normali și cei mutanți. Incidența de atestare a genotipului 380/500 nu a prezentat deosebiri substanțiale între populația sănătoasă și contingentul de bolnavi (respectiv 0,09 și 0,12). În grupul de control, genotipul 530/560 s-a determinat cu o frecvență de 6% din cazuri. Genotipurile 500/500, 380/560, 500/560 și 530/560 la bolnavii de FCU s-au stabilit foarte rar cu o frecvență de 0,02 fiecare. În populația sănătoasă erau mai rare genotipurile 560/560 și 470/560, atestate cu aceeași frecvență - de 0,02, iar genotipurile 500/560, 530/650 și 560/650 s-au identificat cu o frecvență de 0,03 fiecare.

Pentru estimarea semnificației diferențelor se aplica criteriul χ^2 , care a indicat cu o eroare de 0,999 că frecvențele genotipurilor de pe cromozomii mutanți și normali diferă ($\chi^2=26,26$; $df=3$, $p<0,001$).

Tabelul 2

Distribuția de frecvență a genotipurilor VNTR printre bolnavii de fenilcetonurie din Republica Moldova

<i>Genotipul</i>	<i>Numărul</i>	<i>Frecvența</i>
380/380	29	0,491±0,065
380/500	7	0,119±0,042
380/530	14	0,237±0,059
380/560	1	0,017±0,016
500/500	1	0,017±0,016
500/530	2	0,034±0,023
500/560	1	0,017±0,016
530/530	3	0,051±0,028
530/560	1	0,017±0,016
<i>În total</i>	59	1

Pentru a evidenția gradul de asociere a locusului polimorf cu mutațiile genei FAH noi s-a determinat coeficientului-standard de agregare disproporționată Δst (Krawczak, 1988). Valoarea acestuia a fost mai înaltă printre locusurile polimorfe studiate și atingea 0,35. Dezechilibrul de lincaj al sistemului VNTR polimorf cu mutații ale genei FAH se poate utiliza eficient pentru realizarea diagnosticului molecular-genetic al maladiei, precum și pentru identificarea portajului și diagnosticul prenatal al fătului.

Parametru important al sistemului polimorf ce caracterizează informativitatea acestuia în cadrul investigațiilor genetice populaționale și reflectă structura genetică a populației este heterozigotismul. Indicii heterozigotismului factologic și ai celui teoretic, calculați în baza incidenței alelelor VNTR ale genei FAH în populația R. Moldova, au constituit respectiv 73,5% și 68,8%. Eșantionul examinat de noi se apropie după indicii heterozigotismului pentru locusul VNTR de pe gena FAH a populației europene (63%), deosebindu-se considerabil de cel al popoarelor asiatice (33%). Coeficientul de deviere a heterozigotismului factologic de la cel teoretic s-a dovedit a fi neesențial, constituind 0,07. În eșantionul cercetat nu s-au constatat diferențe de valoare statistică între heterozigotismul așteptat și cel apreciat ($\chi^2=0,32$; $p>0,5$).

Cu scopul de a evalua informativitatea sistemelor polimorfe studiate pentru diagnosticul prenatal al fenilcetonuriei au fost examinate doar familii complete (43), adică era obligatorie prezența probandului, a mamei și a tatălui acestuia. Toate sistemele de alele studiate se moșteneau în conformitate cu legile mendeliene. Pentru 48,8% (21) din familiile eșantionului de studiu sistemul VNTR era absolut informativ. În aceste familii este posibil diagnosticul prenatal fără cunoașterea naturii exacte a defectului molecular al genei FAH la proband, folosind doar analiza VNTR. Pentru 12 familii (30%) sistemul VNTR a fost parțial informativ. Prin urmare, 23,2% din familiile restante erau neinformative. Astfel, informativitatea generală pentru sistemul VNTR în populația R. Moldova a constituit 63,8%.

Concluzii

1. Diferențele statistice determinate veridic în distribuția frecvențelor alelelor polimorfe VNTR ($\chi^2=32,15$; $p<0,001$) ale genei FAH pe cromozomii normali și mutanți indică asupra unei informativități înalte a locusurilor cercetate pentru diagnosticul molecular-genetic al FCU la populația R. Moldova.

2. S-au stabilit diferențe statistice în repartizarea frecvenței alelelor VNTR între bolnavii din R. Moldova și din Europa ($\chi^2=34,05$; $p<0,001$), ceea ce este o dovadă a prezenței influenței componențului asiatic asupra structurii genetice a populației R. Moldova.

3. Nivelul înalt al heterozigotității locusului polimorf VNTR este considerat drept marker genetic informativ înalt în caracterizarea structurii genetice a populației R. Moldova.

Bibliografie selectivă

1. Lidsky A., Ledley R., *Regional mapping of the phenylalanine hydroxylase gene and the phenylketonuria locus in human genome*. Proc Nat Acad Sci., 1985; 82:6221-6225.

2. Deka R., Chakraborty R., *A population genetic study of six VNTR loci in three ethnical defined populations*. Genomics, 1991; 11:83-92.

3. Goltsov A., Eisensmith R., Konecki D. et al., *Associations between mutations and a VNTR in the human phenylalanine hydroxylase gene*. Amer Jour Hum Gen., 1992; 51(3):627-636.

4. Eisensmith R., Goltsov A., Woo S., *A simple, rapid and highly informative PCR-based procedure for prenatal diagnosis and carrier screening of phenylketonuria*. Prenatal Diagnosis, 1994; 14(12):1113-1118.

5. Baranovskaya S., Shevtsov S., Maksimova S. et al., *The mutations and VNTRs in the phenylalanine hydroxylase gene of phenylketonuria patients in St. Petersburg*. Jour Inheret Metab Disease, 1996; 19(5): 703-705.

6. Мусиенко А., Лившиц К., *Анализ мутаций и полиморфизмов 30-нуклеотидных тандемных повторов гена PAH в семьях с высокой степенью фенилкетонурии* // Журн. Акад. Мед. Наук Украины, 1996; 2(3):488-495.

7. Ахметова В., Викторова Т., Хуснутдинова Э., *Молекулярно-генетический анализ полиморфизма VNTR аллелей гена фенилаланингидроксилазы у народов Волго-Уральского регион* // Генетика. 2000; 36(8):1116-1165.

Rezumat

S-a efectuat analiza molecular-genetică a caracterului răspândirii frecvenței alelelor și genotipurilor locilor ADN polimorfic a genei FAH în 59 de familii cu FCU și la 68 de indivizi din eșanșionul de populație sănătoasă a R.Moldova. S-a calculat devierea-standard a indicilor teoretic și de facto ai heterozigozității polimorfismului locusului VNTR în populația R. Moldova. A fost determinată diferența statistică semnificativă în distribuirea frecvențelor pe cromozomii normali și pe cei mutanți ($\chi^2=32,15$; $p<0,001$). S-a stabilit informativitatea locusului cercetat pentru diagnosticul FCU în R. Moldova (63,8%).

Summary

We investigated the VNTR polymorphic alleles from phenylalanine hydroxylase gene in Republic of Moldova. We performed molecular-genetics analysis from 59 patients with classical PKU and 68 individuals from controls. Was calculated index of deviation of empiric and theoretic heterozygosity for VNTR polymorphic locus in Moldovan population. Were determined significant differences of frequencies distribution between normal and mutant chromosomes ($\chi^2=32,15$; $p<0,001$). Was analyzed informativity of VNTR polymorphic alleles for PKU diagnosis in Moldavian population (63,8%).